家蚕羧酸酯酶基因克隆及差异表达

高贵田[1,2], 陈克平[1,*], 姚 勤[1], 王林玲[1], 陈慧卿[1]

(1. 江苏大学生命科学研究院, 江苏镇江 212013;
2. 陕西师范大学食品工程系, 西安 710062)

摘要:家蚕浓核病毒(*Bombyx mori* densonucleosis virus, BmDNV)是蚕业生产上危害比较严重的一类病毒。用完全抗浓核病中国镇江株(BmDNV-Z)的家蚕品系秋丰、感性品系华八及以华八为轮回亲本回交8代和自交8代构建的近等基因系 BC_8 为材料,采用mRNA荧光差显技术首次分离克隆了家蚕羧酸酯酶(*B. mori* carboxylesterase, BmCarE)基因全长cDNA,并用实时荧光定量PCR检测了添毒后12 h、36 h、72 h BmCarE在感、抗BmDNV-Z家蚕品系中肠内的表达差异。结果表明:(1)添毒后12 h不同品系家蚕中肠BmCarE表达差异最大,抗性品系 BC_8 和秋丰分别是感性品系华八的17.714倍和3.602倍,三者彼此间的差异达到极显著水平;(2)同一品系添毒后12 h与添清水后12 h BmCarE表达也有较大差异,BC_8 添毒是 BC_8 添清水的15.08倍,秋丰添毒是秋丰添清水的3.39倍,差异达到极显著水平,而华八添毒和添清水的BmCarE表达量均低,二者差异不显著;(3)同一品系添毒后不同时间BmCarE表达也有较大差异,BC_8 和秋丰添毒后12 h BmCarE表达量最高,显著高于各自添毒后36 h和72 h表达水平,而添毒后36 h与72 h表达无显著差异;华八添毒后12 h、36 h和72 h, BmCarE表达无显著差异。上述结果提示羧酸酯酶基因可能与家蚕抗浓核病毒有一定关系。

关键词:家蚕;羧酸酯酶基因;表达差异;近等基因系;RT-PCR

中图分类号:Q966 **文献标识码**:A **文章编号**:0454-6296(2006)06-0930-08

Cloning and differential expression of *Bombyx mori* carboxylesterase gene

GAO Gui-Tian[1,2], CHEN Ke-Ping[1,*], YAO Qin[1], WANG Lin-Ling[1], CHEN Hui-Qing[1] (1. Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China; 2. Department of Food Enginneering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: Total RNA was isolated from the fully resistant silkworm (*Bombyx mori*) strain Qiufeng against BmDNV-Z, the highly susceptible silkworm strain Huaba and near-isogenic line BC_8 which was bred by using Qiufeng to cross with Huaba followed by successive backcrossing to Huaba till the eighth generation, respectively, and then subjected to fluorescent differential display reverse transcription PCR (DDRT-PCR). A full-length cDNA of *B. mori* carboxylesterase was obtained. Its expression in the midgut of the susceptible strain and the resistant strain against BmDNV-Z was analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR at 12 h, 36 h and 72 h after administration with BmDNV-Z. The results showed that: (1) cDNA quantity of carboxylesterase in the midguts of the resistant strains reached the peak 12 h after infection. The cDNA quantity in the resistant strains BC_8 and Qiufeng were 17.714 and 3.602 times respectively that in the susceptible strain Huaba. (2) Within the same strain, there existed a remarkable difference in the detected carboxylesterase cDNA quantity at 12 h between the infected group and the control group. The expression in the resistant strains BC_8 and Qiufeng were 15.08 and 3.39 times respectively that of the control group. On the other hand, the expression of carboxylesterase was quite low in the susceptible strain Huaba of both the infected group and the control group. (3) The expression of carboxylesterase varied at different time after infection. Expression in the resistant strains BC_8 and Qiufeng reached its peaks 12 h after infection,

---

基金项目:国家重点基础研究发展计划'973'项目(2005CB121000);江苏省自然科学基金项目(BK2006074)

作者简介:高贵田,男,1964年4月生,副研究员,研究方向为家蚕分子遗传学,E-mail:gaogui-6451@163.com

* **通讯作者** Author for correspondence, E-mail:kpchen@ujs.edu.cn

收稿日期 Received:2005-11-29;**接受日期** Accepted:2006-09-15

remarkably higher than those at 36 h and 72 h. There was no significant difference of the expression in the susceptible strain Huaba infected for 12 h, 36 h and 72 h. The results suggested that the expression of carboxylesterase in *B. mori* might be related to its resistance against DNV.

Key words: *Bombyx mori*; carboxylesterase gene; differential expression; near-isogenic line; RT-PCR

家蚕浓核病毒（*Bombyx mori* densonucleosis virus，BmDNV）是蚕业生产上危害比较严重的一类病毒。在家蚕 BmDNV 中发现有精胺、亚精胺与腐胺等多胺存在，BmDNV 的多胺对病毒感染具有重要作用（Evans *et al*.，1995；吕鸿声，1998）。BmDNV 感染家蚕感性品系中肠柱状细胞，而不能感染抗性品系中肠柱状细胞。家蚕对 BmDNV-Z（Z 表示浓核病毒镇江株）感染的抵抗性是受 1 对隐性单基因控制的，部分蚕品系表现为完全抗性（向仲怀，1991）。本研究通过组配近等基因系，利用 mRNA 荧光差异显示（DDRT-PCR）技术首次分离克隆了家蚕羧酸酯酶（*Bombyx mori* carboxylesterase，BmCarE）基因全长 cDNA，并用实时荧光定量 PCR 检测了 BmCarE 在感、抗 BmDNV-Z 家蚕品系中肠部位的表达差异。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　家蚕品系：从我国家蚕品系资源中选择全抗 BmDNV-Z 家蚕品系秋丰和感性家蚕品系华八为材料。为了确保实验的准确性，首先对秋丰添加高浓度 BmDNV-Z 病毒，纯化抗性隐性基因（*nsd*/*nsd*），对华八采用蛾区半分法，添加 BmDNV-Z 病毒（以下简称添毒），筛选全感蛾区（$+^{nsd}/+^{nsd}$）。然后以华八为轮回亲本回交 8 代和自交 8 代构建的近等基因系 BC$_8$，其遗传背景和华八相近，但保留了抗性基因（*nsd*/*nsd*）。3 个家蚕品系在本室按常规方法饲养。

1.1.2　接种病毒和取材：用 0.5% BmDNV-Z（本室保存）病蚕肠干液经口接种秋丰、华八和 BC$_8$ 5 龄起蚕，饲养 12 h、36 h 和 72 h 后，各取 10 头蚕的后部中肠，分别用秋丰（DNV）、华八（DNV）和 BC$_8$（DNV）表示，用 0.01% DEPC 水清洗后于 −70℃保存备用。添食清水作为对照，处理与添毒区相同，分别用秋丰（水）、华八（水）和 BC$_8$（水）表示。

1.1.3　仪器与试剂：定量 PCR 仪为 Mx3000P™ 型 PCR 仪（Stratagene 公司），SYBR® Premix Ex Taq™（Perfect Real Time，TaKaRa 公司），荧光定量 PCR 反应专用管和八联盖购自英国 ABgene 公司，FMBIO Ⅱ型荧光图像显示系统（美国日立公司），克隆载体（pMD-18T）、质粒 DNA 抽提（Mimi BEST Plasmid Purification Kit）试剂盒均为 TaKaRa 公司产品，总 RNA 提取试剂盒（Rneasy Mini Kit QIAGEN）为 QIAGEN 公司产品，荧光差显试剂盒（包括差显引物）（GenHunter RNAspectra）为 GenHunter 公司产品，5′-RACE 试剂盒（BD SMART RACE cDNA Amplification Kit）为 BD 公司产品，5′-RACE 特异引物、实时荧光定量 PCR 特异引物由上海生工生物公司合成。

1.2　荧光差异显示

1.2.1　组织总 RNA 提取：分别用添毒后 12 h 的秋丰（DNV）、华八（DNV）和 BC$_8$（DNV）的中肠抽提总 RNA，参照 Rneasy Mini Kit QIAGEN 试剂盒说明书进行。

1.2.2　cDNA 第 1 链合成：取总 RNA 0.2 μg 反转录，反转录和 PCR 反应操作均按 GenHunter RNAspectra 试剂盒说明书进行。反转录体系：总体积 20 μL，包括锚定引物 H-T(11)M（M 为 A、G、C，下同）4 μmol/L，dNTPs 400 μmol/L，5 × RT 缓冲液 4 μL，M-MLV 酶 1 U，加 0.01% DEPC 水至 20 μL。反应条件：先将 H-T(11)M、dNTPs、5 × RT 缓冲液、总 RNA、0.01% DEPC 水按上述体系混匀，65℃ 5 min，立即冰上 2 min，加入 1 U M-MLV 酶，37℃ 60 min，75℃ 5 min。

1.2.3　RT-PCR：以 3 种荧光锚定引物 FH-T(11)M 和 8 种随机引物 HAPn 作不同组合，进行 24 轮 RT-PCR 反应。PCR 体系为：总体积 20 μL，包括 10 × PCR 缓冲液 2.0 μL，dNTPs 400 μmol/L，FH-T(11)M 4 μmol/L，HAPn 4 μmol/L，cDNA 2 μL，Taq 酶（Qiagen）1 U，加超纯水至 20 μL。反应条件为：92℃ 30 s，40℃ 2 min，72℃ 1 min，40 个循环，72℃ 7 min。

1.2.4　序列测定及同源性分析：克隆载体用 TaKaRa pMD-18T，转化大肠杆菌 DH5α，用 PCR 鉴定阳性克隆，质粒 DNA 抽提用 TaKaRa Mimi BEST Plasmid Purification Kit，序列测定在本室 CEQ8000 上完成。

1.2.5　5′-RACE：参照 BD SMART RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行。根据来自 BC$_8$ 抗性特异片段 A11（922）序列设计的下游引物序列为 5′-

GCTAATGCTAAGAAGTTGGCCAAAAAGA-3′，上游引物（NUP引物）序列为5′-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3′。

1.3 实时荧光定量PCR

1.3.1 总RNA提取：用添毒后12 h、36 h、72 h的秋丰（DNV）、华八（DNV）和BC$_8$（DNV）以及相同时间的对照秋丰（水）、华八（水）和BC$_8$（水）18个材料中肠提取总RNA，方法同1.2.1节。

1.3.2 cDNA第1链的合成：用Promege反转录试剂盒，参照说明书进行。反转录体系：总体积25 μL，包括5×RT缓冲液5.0 μL，oligod T$_{(11)}$ 4 μmol/L，dNTPs 2 000 μmol/L，rRNasin® -Ribonuclease Inhibitor 0.7 μL，总RNA 2.0 μg，1 U M-MLV酶，加0.01% DEPC水至25.0 μL。反应条件同1.2.2节。

1.3.3 引物设计：采用相对定量法，以家蚕细胞质*actin A*3基因作为内标参比基因。引物用DNAStar 6.0软件设计，*actin A*3基因引物序列：F：5′-GGATGTCCACGTCGCACTTCA-3′，R：5′-GCGCGGCTACTCGTTCACTACC-3′，扩增产物片段长度为284 bp；BmCarE引物序列：F：5′-CGTAACAAAAGGAAGAAATCGCGAAAAAGGTCA-3′，R：5′-TGTGTCGCGTTCAAGCCGTCTAA-3′，扩增产物片段长度为233 bp。

1.3.4 定量PCR反应：参照SYBR® Premix Ex Taq™（Perfect Real Time）试剂盒说明书进行。体系为10.0 μL，其中含有SYBR Green Ⅰ Mix 5.0 μL，上下游引物终浓度各为0.1 μmol/L，5×ROX 0.2 μL，10倍稀释的cDNA 2.0 μL。反应流程为：95℃ 预变性60 s，然后95℃ 40 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，40个循环。在每个循环退火时仪器自动收集一次荧光信号。最后进行熔解曲线分析，温度持续上升（0.1℃/s）至95℃。

1.3.5 扩增效率的计算：取BC$_8$添毒后12 h的cDNA进行系列稀释（80、40、20、10、5 ng）后进行扩增，体系为10.0 μL，其中含有稀释后的cDNA 2.0 μL，SYBR Green Ⅰ Mix 5.0 μL，上下游引物终浓度各为0.1 μmol/L，5×ROX 0.2 μL，反应流程、熔解曲线分析同1.3.4节。各样本均重复3次，另加3个无模板的阴性对照。以3次重复的C_t值的平均值对浓度的对数作图，得到斜率S，用公式$E = 10^{s} - 1$计算扩增效率（张蓓等，2005）。

1.3.6 数据分析与统计学处理：每个样品在96孔板重复3次，以消除实验误差。参照文献（Winer *et al*.，1999；Schmittgen *et al*.，2000；Trevaskis *et al*.，2004）用$2^{-(C_{t1}-C_{t2})-(C_{t3}-C_{t4})}$值代表BmCarE基因的相对表达水平，$C_t$为达到阈值的循环数，$C_{t1}$为各品系、不同时间、添毒与添水BmCarE的$C_t$值，$C_{t2}$为各品系、不同时间、添毒与添水*actin A*3的C_t值，C_{t3}和C_{t4}分别代表添毒后12 h感性品系华八BmCarE与*actin A*3的C_t值。相对表达量用SPSS 13.0软件方差分析，$P < 0.05$差异表明有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 荧光差异表达结果

以3种荧光锚定引物和8种随机引物（HAP10～HAP18）作24个组合，对添毒后12 h的秋丰、华八、BC$_8$ 3个家蚕品系进行DDRT-PCR研究，共获得3 621条带，差异带168条，在抗性品系中出现158条特有带，在感性品系中出现10条特有带。其中由荧光锚定引物H-T（11）A和随机引物H-AP11扩增的A11（922）差显结果如图1所示。

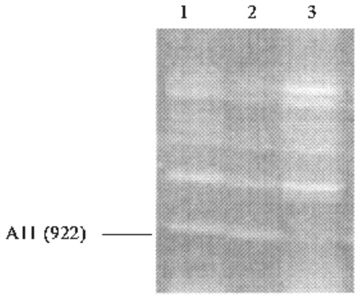

图1 A11（929）差异表达结果

Fig. 1 Differential display of A11（922）

1：BC$_8$添毒 BC$_8$ administered with BmDNV-Z；2：秋丰添毒 Qiufeng administered with BmDNV-Z；3：华八添毒 Huaba administered with BmDNV-Z.

2.2 差异片段的序列测定和同源性分析

对来自于抗性品系的16条差异非常明显的带进行克隆测序，将测序结果在GenBank数据库中进行同源性比较，并通过对每个序列所编码的氨基酸进行分析，结果显示A11（922）序列的3～914 bp与NCBI数据库中家蚕（Ctg014087）7 961～8 869 bp同源性为98%，编码的氨基酸与意大利蜜蜂*Apis mellifera*的羧酸酯酶同源性为34%，与抗性有一定相关性，因此继续进行全长克隆。其他15条带似乎与抗性没有明显的关系（数据未显示），未作进一步分析。

2.3 A11（922）片段5′-RACE分析

用A11（922）特异引物和NUP引物，以5′-RACE的cDNA为模板，进行PCR扩增，得到720 bp的单一

条带(图 2)。克隆测序并与 A11(922)重叠区信息拼接得到 1 602 bp 的全长 cDNA。该序列 ORF 为 1 458 bp,终止密码子为 TAG,还包含 19 bp 的 5′非翻译序列、多聚核苷酸加尾信号 GGTATAAATT(HCpolya 软件预测,http://l25.itba.mi.cnr.it/webgene/wwwHC_polya.html)以及 11 个碱基的 Poly(A)尾巴和 106 bp 的 3′非翻译区序列。该序列的 ORF 与家蚕基因组测序预测的家蚕羧酸酯酶 Bmb01462 基因的 ORF 相比,同源性为 97%。Bmb01462 基因有 2 个外显子,第 1 个外显子长 287 bp,第 2 外显子长 1 271 bp。我们得到的 A11 全长 cDNA 序列的 ORF 的 1 ~ 190 bp 与 Bmb01462 基因的第 1 外显子的 1 ~ 190 bp 完全相同,但缺少了

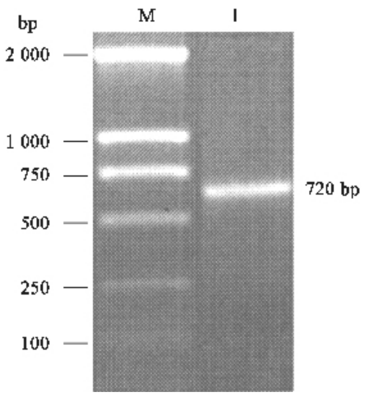

图 2　A11(922) RACE 结果

Fig. 2　Result of A11(922) RACE

M：DNA ladder DL2000；1：A11(922) RACE.

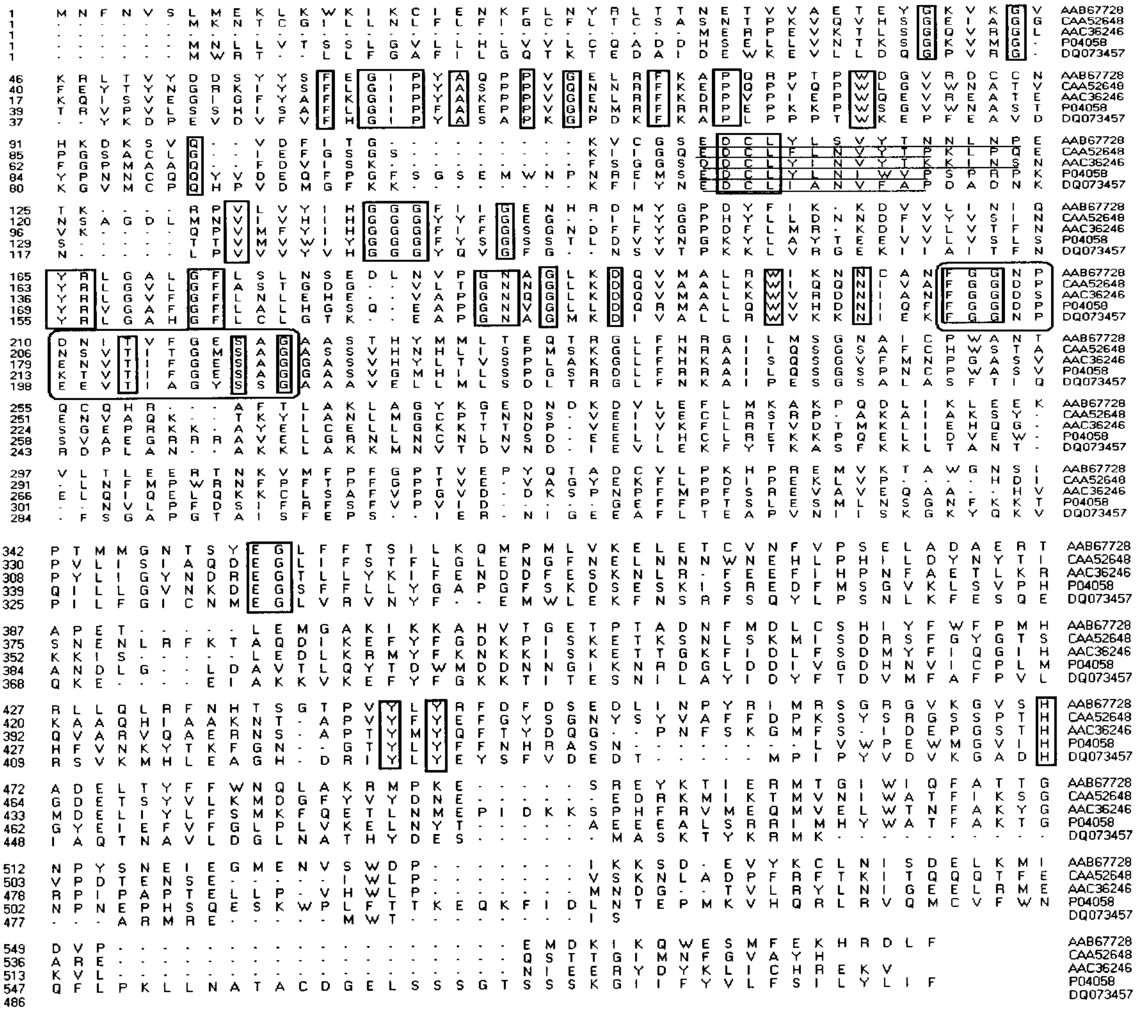

图 3　家蚕(GenBank 登录号：DQ073457)与铜绿蝇(AAB67728)、桃蚜(CAA52648)、金小蜂(AAC36246)羧酸酯酶及电鳐(P04058)乙酰胆碱酯酶的氨基酸序列同源性比对

Fig. 3　Homology alignments of CarE among *Bombyx mori*(DQ073457), *Lucilia cuprina*(AAB67728), *Myzus persicae*(CAA52648) and the deduced amino acid sequence of *Anisopteromalus calandrae*(AAC36246) with acetylcholinesterase of *Torpedo californica*(P04058)

椭圆方框表示丝氨酸活性中心保守结构域,下划线表示二硫键保守结构域,矩形方框表示完全同源序列。The serine conserved domain of the active center was marked with elliptical boxes. The conserved domain of disulfide bond were underlined. The completely homologous sequences were marked with rectangular boxes.

Bmb01462 基因第 1 外显子的 191 ~ 287 bp(97 bp)序列，A11 (922) cDNA 序列的 191 ~ 1 461 bp 与 Bmb01462 基因的第 2 个外显子(1 271 bp)同源性为 99%，有 8 bp 的差异。A11 全长 cDNA 序列的 ORF 编码 486 个氨基酸。对其氨基酸序列用 ScanProsite 软件(http ://www.expasy.org/prosite/)分析，发现该序列具有羧酸酯酶的保守结构域：1 个丝氨酸活性中心“ FGGNPEEVTIAGYSSG ”和 1 个二硫键形成的位点“ EDCLIANVFAP ”。因此，把该蛋白序列命名为家蚕羧酸酯酶(*B. mori* carboxylesterase，BmCarE)。该序列已在 GenBank 上登录(登录号 DQ073457)。将家蚕羧酸酯酶与铜绿蝇 *Lucilia cuprina* (Newcomb *et al.*，1997)、桃蚜 *Myzus persicae* (Linda *et al.*，1993)、金小蜂 *Anisopteromalus calandrae* (Zhu *et al.*，1999)及电鳐 *Torpedo californica* 乙酰胆碱酯酶前体(acetylcholinesterase precursor)(Schumacher *et al.*，1986)进行同源性比较(图 3)，发现几种酯酶间的同源性较低，但在活性中心处的序列高度保守。

2.4 实时荧光定量 PCR 结果

2.4.1 熔解曲线：Real-time PCR 反应结束后，自动生成熔解曲线(图 4)，*actin A*3 和 BmCarE 分别在 81℃和 88℃有明显主峰，无杂峰出现，表明 PCR 产物中没有引物二聚体，*actin A*3 引物与 BmCarE 引物引导的扩增是 *actin A*3 和 BmCarE 的特异性扩增。荧光定量 PCR 产物电泳后 FMBIOⅡ型荧光图像显示系统上扫描(图略)，结果也表明扩增的特异性很高。

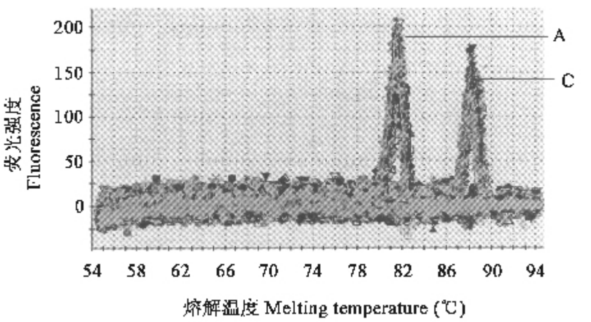

图 4 熔解曲线

Fig. 4 Melting curve

A：*actin A*3 特异引物扩增产物熔解主峰位于 81℃ The melting peak of the amplified products with *actin A*3 specific primer mostly located in 81℃；C：家蚕羧酸酯酶特异引物扩增产物熔解主峰位于 88℃ The melting peak of the amplified products with BmCarE specific primer mostly located in 88℃.

2.4.2 BmCarE 与 *actin A*3 的扩增效率：为了建立适时 PCR 反应条件，并检测 BmCarE 与 *actin A*3 的扩增效率，我们用系列稀释的 BC_8 添毒后 12 h cDNA 为模板，绘制 BmCarE 与 *actin A*3 相对定量的标准曲线(图 5)。显示待测目标基因 BmCarE 和参比基因 *actin A*3 与 C_t 值都具有很好的线性关系，相关系数 R^2 分别为 0.9797 和 0.9957，用公式 $E = 10^s - 1$ 计算出 BmCarE 与 *actin A*3 的扩增效率分别为 0.9999 和 0.9999，据胡成进等(2005)方法可以判断 BmCarE 与 *actin A*3 的扩增效率是相同的。

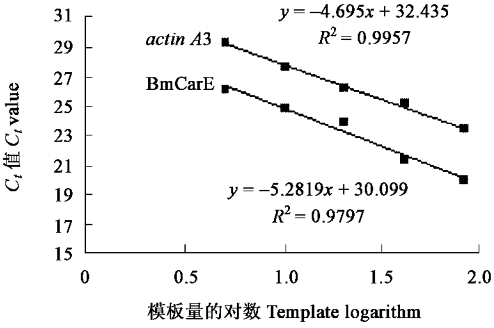

图 5 BmCarE 和 *actin A*3 模板量的对数与 C_t 值的关系

Fig. 5 The relation between C_t and template logarithm of BmCarE and *actin A*3

2.4.3 BmCarE 表达差异：因为 BmCarE 与 *actin A*3 的扩增效率一致，且十分接近于 1，因此，可用公式 $2^{-(C_{t1} - C_{t2}) - (C_{t3} - C_{t4})}$ 表示待测基因 BmCarE 的相对表达量(张蓓等，2005)。将结果用 SSPS13.0 进行分析如表 1 所示。

添毒后 12 h 不同家蚕品系 BmCarE 表达差异最大，抗性品系 BC_8 (DNV) 相对表达量为 17.714 ± 2.558，秋丰(DNV)为 3.602 ± 0.483，感性品系华八(DNV)为 1.000 ± 0.000。BC_8 (DNV)和秋丰(DNV)分别是华八(DNV)的 17.714 倍和 3.602 倍，差异达到极显著水平(表 1、图 6)。说明有抗性基因(*nsd*/*nsd*)的家蚕在受到 DNV 病毒攻击后，中肠 BmCarE 基因比感性品系($+^{nsd}/+^{nsd}$)出现高水平的表达。

添毒与添清水处理后家蚕不同品系 BmCarE 的表达差异：添毒后 12 h 抗性品系 BC_8 (DNV)相对表达量为 17.714 ± 2.558，而添清水时 BC_8 (水)为 1.174 ± 0.120，BC_8 (DNV)是 BC_8 (水)的 15.08 倍，差异达到极显著水平；添毒后 36 h、72 h BC_8 (DNV)与添水 BC_8 (水)无显著差异；添毒 12 h 抗性品系秋丰(DNV)为 3.602 ± 0.483，是秋丰(水)1.062 ± 0.268 的 3.39 倍，差异达到极显著水平，添毒后 36 h、72 h 秋丰(DNV)与秋丰(水)无显著差异。添毒后 12 h、36 h、72 h 感性品系华八(DNV)与华八(水)BmCarE

相对表达量均低，二者差异不显著（表 1）。该结果也同样说明 BmCarE 基因的表达差异与病毒 DNV 诱导有关，但同时也与基因型（*nsd*/*nsd*）抗性和感性（$+^{nsd}/+^{nsd}$）有关。

添毒后不同时间家蚕不同品系 BmCarE 的表达差异：添毒后 12 h BC_8（DNV）和秋丰（DNV）BmCarE 的相对表达量最高，分别为 17.714 ± 2.558 和 3.602 ± 0.483，添毒后 36 h 急剧下降分别为 1.034 ± 0.128 和 1.078 ± 0.164，差异达到极显著水平，添毒后 72 h 保持在较低水平，分别为 0.874 ± 0.062 和 0.880 ± 0.374，与添毒后 36 h 相比无显著差异。添毒后 12 h、36 h 和 72 h 华八（DNV）BmCarE 基因表达均在较低水平，彼此间无显著差异（表 1、图 7）。该结果说明 BmCarE 基因的表达差异不仅与病毒 DNV 诱导及基因型（*nsd*/*nsd*）抗性和感性（$+^{nsd}/+^{nsd}$）有关，还与诱导后所经历的时间有关。

表 1　家蚕感、抗 BmDNV-Z 品系 BmCarE 的相对表达量

Table 1　Relative expression of BmCarE silkworm strains resistant and susceptible against BmDNV-Z

品系 Strain	添毒后经历时间（h）Hours after administered with BmDNV-Z		
	12	36	72
BC_8（DNV）	17.714 ± 2.558 aA	1.034 ± 0.128 cC	0.874 ± 0.062 cC
BC_8（水）BC_8（water）	1.174 ± 0.120 cC	0.848 ± 0.147 cC	1.163 ± 0.148 cC
秋丰（DNV）Qiufeng（DNV）	3.602 ± 0.483 bB	1.078 ± 0.164 cC	0.880 ± 0.374 cC
秋丰（水）Qiufeng（water）	1.062 ± 0.268 cC	1.141 ± 0.168 cC	0.934 ± 0.028 cC
华八（DNV）Huaba（DNV）	1.000 ± 0.000 cC	0.716 ± 0.128 cC	1.096 ± 0.149 cC
华八（水）Huaba（water）	0.814 ± 0.062 cC	0.868 ± 0.116 cC	0.758 ± 0.363 cC

注 Notes：表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准差；同列数据后相同字母表示多重比较差异不显著，小写字母表示 $P = 0.05$ 水平，大写字母表示 $P = 0.01$ 水平。Each value represents the mean ± *SD* of 3 determinations; means within the column followed by the same letter indicated no significant difference at $P = 0.05$ (in small letter) and $P = 0.01$ (in capital letter).

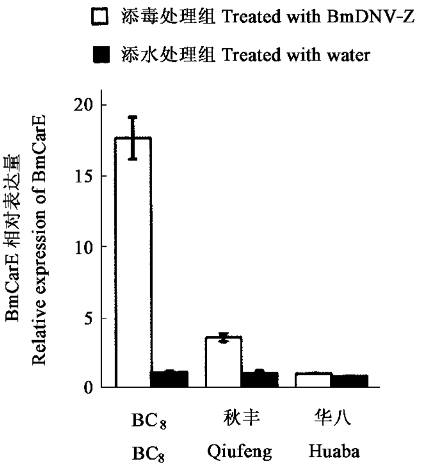

图 6　添毒 12 h 后不同家蚕品系 BmCarE 的表达差异

Fig. 6　Varied expressions in different strains after administered with BmDNV-Z for 12 h

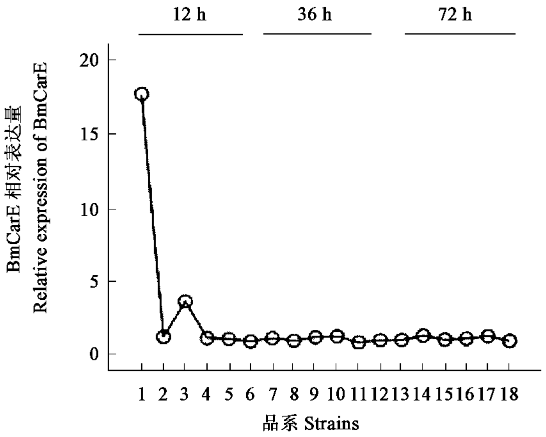

图 7　家蚕各品系添毒与添清水处理后不同时间 BmCarE 相对表达量散点图

Fig. 7　Scatter diagram of relative expression of BmCarE in different strains administered with BmDNV-Z and water in varied time

1，7，13：BC_8（DNV）；2，8，14：BC_8（水）BC_8（water）；3，9，15：秋丰（DNV）Qiufeng（DNV）；4，10，16：秋丰（水）Qiufeng（water）；5，11，17：华八（DNV）Huaba（DNV）；6，12，18：华八（水）Huaba（water）.

3　讨论

昆虫与其他动物的羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶都属于丝氨酸蛋白水解酶家族成员，它们有许多保守结构的特征，特别是在围绕着活性位点周围的结构，即使序列之间没有可识别的类似性，这些结构也是保守的（Ollis *et al*.，1992）。目前已克隆了多种昆虫及其他动物的羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶基因，经过比较发现所有的羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶都含有一个保守的活性中心序列，即 TIFGESAGA，这几个氨基酸在丝氨酸家族中是高度保守的（Field *et al*.，1993；郭惠琳和高希武，2005）。郭惠琳和高希武（2005）将克隆的氧化乐果抗性棉蚜羧酸酯酶 cDNA 氨基酸序列和其他丝氨酸水解酶家族的氨基酸序列比较，推测棉蚜羧酸酯酶的活性中心为

TIFGESAGA。根据 ScanProsite 软件(http://www.expasy.org/prosite/)的算法原理,羧酸酯酶有 2 个保守结构域,1 个是丝氨酸活性中心,F-[GR]-G-x(4)-[LIVM]-x-[LIV]-x-G-x-S-[STAG]-G,另 1 个是二硫键形成的位点:[ED]-D-C-L-[YT]-[LIV]-[DNS]-[LIV]-[LIVFYW]-x-[PQR](其中“[]”表示不同物种在该位点是其中的 1 个氨基酸)。我们克隆的家蚕羧酸酯酶用该软件分析,发现该序列具有羧酸酯酶的保守结构域:1 个丝氨酸活性中心“FGGNPEEVTIAGYSSG”和 1 个二硫键形成的位点“EDCLIANVFAP”。通过对家蚕、铜绿蝇等 5 种生物羧酸酯酶的同源性比较,我们发现几种酯酶间的同源性较低,但在活性中心处的序列高度保守(图 4),与郭惠琳和高希武(2005)的研究结果一致。

mRNA 差显技术(Liang and Arthur,1992)已成为分离新基因的有效方法,该技术尚存在的主要缺陷是所得特异性 cDNA 片段克隆假阳性的比例高,有时甚至高达 85%。假阳性率高的主要原因是由于分离胶的分辨力的局限性,导致序列胶中显示的一条特异 cDNA 带中可能含有放射性自显影所检测不到的重叠带。众多的研究证明,从序列胶中回收的单一 cDNA 带中含有至少 3 种不同的序列(Li *et al*.,1994)。引物与 cDNA 模板之间的特定匹配情况的不同,也是导致假阳性高的原因之一。由于高假阳性的存在,往往导致对基因表达差异的错误认识。因此 DDRT-PCR 获得的差异片段,必须通过 Northern、反向 Northern(Zhang *et al*.,1996)等方法验证。Northern 杂交一直被认为是验证差异片段来源的‘金标准’,但 Northern 及反向 Northern 亦存在有放射性污染、对差异表达基因不能精确定量的不足,而 Real-time PCR 具有灵敏性高、特异性高、可以对差异表达基因精确定量、无放射性污染等优点,因此,Real-time PCR 或者 Northern、反向 Northern 与 Real-time PCR 联合使用,有利于更深刻地了解基因表达差异的本质。在本研究中,3 个家蚕品系 DDRT-PCR 结果发现,抗性品系秋丰、BC_8 有 A11(922)片段,感性品系华八无该片段,而在 Real-time PCR 结果中 3 个品系均有该片段,可能由于上述原因而出现的‘假阳性’,在进行 Real-time PCR 时,我们使用 23~28 bp 的特异引物,提高了退火温度,增加了反应的特异性,发现 3 个品系均有该基因的表达,存在量的差异,从而真实的反应了该基因的表达状况。

本研究运用的是 Real-time PCR 相对定量的比较 C_t 法,该法是运用数学公式来计算相对量,以靶基因和参比基因的扩增效率基本一致为前提。先用普通 PCR 试剂优化了 Real-time PCR 反应条件。通过熔解曲线分析及荧光定量 PCR 产物电泳后 FMBIO Ⅱ 型荧光图象显示系统上扫描分析,证实了扩增条件的可靠性。同时采用系列稀释法(胡成进等,2005)测定了待测目标基因 BmCarE 与参比基因 *actin A*3 的扩增效率。证实 BmCarE 与 *actin A*3 的扩增效率非常一致,从而保证了定量结果的真实可靠。

本研究用 Real-time PCR,并按统计学原则对每个样品进行 3 次重复,对结果进行方差分析,系统比较了添毒后 12 h、36 h、72 h 家蚕 BmCarE 表达差异。结果表明 BmCarE 表达差异不仅与 DNV 诱导及抗性(*nsd*/*nsd*)和感性($+^{nsd}/+n^{sd}$)基因型有关,还与诱导后所经历的时间有关。抗性品系 BC_8、秋丰在 BmDNV-Z 侵染后 12 h,BmCarE 大量表达,而感性品系华八在 BmDNV-Z 侵染后,BmCarE 表达量仍很低。据此推测,BmCarE 大量表达是抗性品系 BC_8、秋丰对 BmDNV-Z 的侵染的一种防卫应答。现已明确,家蚕对 BmDNV-Z 的抗性是隐性单基因(*nsd*/*nsd*)控制的,虽然我们还不明确 BmCarE 是否就是抗性基因(*nsd*/*nsd*),至少可以肯定 BmCarE 基因的表达上调和下调是与抗性基因(*nsd*/*nsd*)密切相关的。这种关系也可能是直接关系,也可能是间接的级联反应。实时荧光定量 PCR 结果还显示添毒后 12 h BmCarE 相对表达量,BC_8(DNV)显著高于秋丰(DNV)。其原因有待于进一步研究。

多胺是一类小分子脂肪族非蛋白含氮化合物,包括腐胺、精脒和精胺,存在于体内各种组织和细胞中,参与多种细胞生理过程,如 DNA、RNA 和蛋白质的合成,细胞生长、增殖和分化等(Pegg and McCann,1988),BmDNV 病毒中的多胺能借中和负电荷而有助与把基因组 DNA 装入病毒粒子,因此在病毒发育循环中起重要作用(吕鸿声,1998)。哺乳动物细胞多胺的代谢主要受精脒/精胺-乙酰基转移酶(SSAT)和多胺氧化酶(PAO)的调节,主要调控多胺的氧化和乙酰化过程(Wallace and Mackarel,1998)。另一方面,国内外对羧酸酯酶研究表明:羧酸酯酶与昆虫对有机磷杀虫剂产生抗性有较大的相关性,抗性越强,羧酸酯酶的活力越高(Whyard *et al*.,1995)。羧酸酯酶对酰胺类化合物也有较强的水解能力(滕霞和孙曼霁,2003),通过水解多胺乙酰化的产物,促进多胺乙酰化,从而降低外源多胺在细胞中积累。据此推测,抗性品系 BC_8、秋丰在受到 BmDNV-Z 侵染时,大量表达的 BmCarE,水解了 BmDNV 所含多胺

的乙酰化产物，促进 BmDNV 多胺乙酰化，从而阻止了 BmDNV-Z 进入抗性品系中肠的柱状细胞，产生抗性；而感性品系在受到病毒的侵染后，由于羧酸酯酶活性弱，而不能有效地消解多胺，使病毒仍然能进入细胞而导致发病。该推测还有待于进一步研究证实。

参 考 文 献（References）

Evans CH，Lee TS，Flugelman AA，1995. Spermine-directed immunosuppression of cervical carcinoma cell sensitivity to a majority of lymphokine-activated killer lymphocyte cytotoxicity. *Nat. Immun.*，14：157－163.

Field ML，Williamson SM，Moores DG，Devonshire LA，1993. Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid，*Myzus persicae*（Sulzer）. *Biochemistry*，294：569－574.

Guo HL，Gao XW，2005. The mutation of carboxylesterase gene of cotton aphid，*Aphis gossypii* associated with omethoate resistance. *Acta Entomologica Sinica*，48（2）：194－202.［**郭惠琳，高希武，**2005. **棉蚜抗氧化乐果品系的羧酸酯酶基因突变. 昆虫学报，**48（2）：194－202］

Hu CJ，Shen X，ChenYJ，Wen XM，2005. Development and primary application of real-time quantitative polymerase chain reaction for the detection of human breast cancer related novel dene-kallikrein gene 6 expression. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*，28（6）：610－612.［**胡成进，沈茜，陈英剑，闻新棉，**2005. **乳腺癌** klk6 **基因表达的实时荧光定量法的建立及初步应用. 中华检验医学杂志，**28（6）：610－612］

Li F，Barnathan ES，Kariko K，1994. Rapid method for screening and cloning cDNA generated in differential mRNA display：application of Northern blot for affinity capturing of cDNAs. *Nucleic Acids Research*，22：1 764－1 765.

Liang P，Pardee AB，1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*，257（14）：967－971.

Lu HS，1998. Molecular Biology of Insect Viruses. Beijing：China Agriculture Press. 396－397.［**吕鸿声，**1998. **昆虫病毒分子生物学. 北京：中国农业出版社.** 396－397］

Newcomb RD，Campbell PM，Russell RJ，Oakeshott JG，1997. cDNA cloning，baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase，E3，involved in organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，27（1）：15－25.

Ollis DL，Cheah E，Cygler M，Dijkstra B，Frolow F，Franken SM，1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering*，5：197－211.

Pegg AE，McCann PP，1988. Polyamine metabolism and function in mammalian cells and protozoans. *ISI Atlas of Science：Biochemistry*，1：11－18.

Schmittgen TD，Zakrajsek BA，Mills AG，Gorn V，Singer MJ，Reed MW，2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay：comparison of endpoint and realtime methods. *Anal. Biochem.*，285（2）：194－204.

Schumacher M，Camp S，Maulet Y，Newton M，MacPhee-Quigley K，Taylor SS，Friedmann T，Taylor P，1986. Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*，319（6 052）：407－409.

Teng X，Sun MJ，2003. Advances on carboxylesterase research. *Chinese Bulletin of Life Sciences*，15（1）：31－35.［**滕霞，孙曼霁，**2003. **羧酸酯酶研究进展. 生命科学，**15（1）：31－35］

Trevaskis J，McMillan JS，Windmill K，Walder K，Collier GR，2004. Identification of hypothalamic genes implicated in the development of obesity in *Psammomys obesus* using differential display PCR. *Comparative Biochemistry and Physiology B*，137：65－73.

Wallace HM，Mackarel AJ，1998. Regulation of polyamine acetylation and efflux in human cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.*，26（4）：571－575.

Whyard S，Downe AE，Walker VK，1995. Characterization of a novel esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*，29（4）：329－342.

Winer J，Jung CK，Shackel I，Williams PM，1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Anal. Biochem.*，270（1）：41－49.

Xiang ZH，1991. Genetics and Thremmatology of *Bombyx mori*. Beijing：China Agriculture Press. 233－234.［**向仲怀，**1991. **家蚕遗传育种学. 北京：中国农业出版社.** 233－234］

Zegzouti H，Marty C，Jones B，Bouquin T，Latché A，Pech JC，Bouzayen M，1997. Improved screening of cDNAs generated by mRNA differential display enables the selection of true positives and the isolation of weakly expressed messages. *Plant Molecular Biology Reporter*，15：236－245.

Zhang B，Yuan XL，Shen LS，2005. Detection of PAX5 mRNA expression in haematological tumor cell lines by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Laboratory Medicine*，20（2）：126－129.［**张蓓，袁向亮，沈立松，**2005. **实时荧光定量** RT-PCR **检测血液肿瘤细胞株** PAX5 mRNA **表达. 检验医学，**20（2）：126－129］

Zhang H，Zhang R，Liang P，1996. Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucleic Acids Research*，24（12）：2 454.

Zhu YC，Dowdy AK，Baker JE，1999. Differential mRNA expression levels and gene sequences of a putative carboxylesterase-like enzyme from two strains of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae*（Hymenoptera：Pteromalidae）. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，29：417－425.

（责任编辑：黄玲巧）